

Identifikasi Isolat Khamir Berpotensi sebagai Agens Antagonis dan Uji Produksi Toksin Hemolisin

Sri Hartati^{1*}, Suryo Wiyono², Sri Hendrastuti Hidayat², dan Meity Suradji Sinaga²

¹Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Bandung-Sumedang KM 21, Jatinangor, Indonesia 45363

²Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor,
Jl. Kamper Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

*Email: s.hartati@unpad.ac.id

INFO ARTIKEL	ABSTRACT/ABSTRAK
Diterima: 13-06-2021 Direvisi: 28-07-2021 Dipublikasi: 11-08-2021	Identificaton of Potential Yeast Isolates as Antagonistic Agents and Testing of Their Ability to Produce Hemolysin Toxin
Keywords: words: <i>Aureobasidium pullulans</i> , Hemolysin toxin, Molecular identification, <i>Pseudozyma</i> , <i>Rhodotorula minuta</i>	Yeast identification can be done conventionally and molecularly. Conventional identification requires long period of time to complete and has a subjective interpretation. Results of molecular method will be more accurate and takes a shorter time compared to conventional method. Antagonistic yeasts as biocontrol agents should has to be safe to the nontarget organisms when they are applied in the field. This study was objected to molecularly identify some antagonistic potential yeast isolates, and to evaluate their risk on mammals. Fifteen yeast isolates were evaluated for their potential antagonistic to <i>Colletotrichum acutatum</i> , the causal agent of anthracnose on chili. The molecular identification was carried out by PCR method using ITS1 and ITS4 primers. The yeast isolates were cultured on Yeast Malt Extract Broth (YMB) and Potato Dextrose Agar (PDA). To study for their risk on mammals, the isolates were cultured on blood agar base (Oxoid CM55) added with sheep blood 5%. The molecular identification results showed that the isolates were successfully amplified by ITS1 and ITS4 primers, the fragment size were 500-800pb. The sequencing results were six yeast spesies, i.e. <i>Candida tropicalis</i> , <i>Rhodotorula minuta</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Pseudozyma hubeiensis</i> , <i>Pseudozyma aphidis</i> , and <i>Pseudozyma shanxiensis</i> . All yeast isolates tested were not produce hemolysin toxin, therefore they were suspected not pathogenic to human.
Kata Kunci: <i>Aureobasidium pullulans</i> , Identifikasi molekuler, <i>Pseudozyma</i> , <i>Rhodotorula minuta</i> , Toksin hemolisin	Identifikasi khamir dapat dilakukan secara konvensional maupun molekuler. Identifikasi secara konvensional membutuhkan waktu yang lama dan interpretasi hasilnya seringkali bersifat subyektif. Sementara identifikasi khamir dengan metode molekuler dapat memberikan hasil yang lebih akurat dan cepat. Khamir yang berperan sebagai agens antagonis harus aman terhadap organisme nontarget agar dapat diaplikasikan di lapangan. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi isolat-isolat khamir berpotensi antagonis dengan metode molekuler dan mengetahui kemampuan khamir dalam menghasilkan hemolisin sebagai salah satu indikator potensi resiko terhadap mamalia. Identifikasi dan pengujian kemampuan khamir dalam menghasilkan hemolisin dilakukan pada 15 isolat khamir berpotensi antagonis terhadap patogen antraknosa cabai (<i>Colletotrichum acutatum</i>). Identifikasi khamir dilakukan secara molekuler dengan PCR menggunakan primer ITS1 dan ITS4. Penyediaan khamir menggunakan media <i>Yeast Malt Extract Broth</i> (YMB) dan <i>Potato Dextrose</i>

Agar (PDA). Pengujian kemampuan khamir dalam menghasilkan hemolisin menggunakan media *blood agar base* (Oxoid CM55) ditambah darah domba 5%. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat khamir dapat teramplifikasi dengan primer ITS1 dan ITS4 dengan ukuran fragmen produk antara 500-800 pb. Hasil analisis sekuensing didapatkan 6 spesies khamir yaitu *Candida tropicalis*, *Rhodotorula minuta*, *Aureobasidium pullulans*, *Pseudozyma hubeiensis*, *Pseudozyma aphidis*, dan *Pseudozyma shanxiensis*. Uji kemampuan khamir dalam menghasilkan hemolisin menunjukkan bahwa seluruh khamir yang diuji tidak menghasilkan toksin hemolisin sehingga diduga isolat-isolat tersebut tidak patogenik terhadap manusia.

PENDAHULUAN

Khamir merupakan salah satu mikroorganisme yang memiliki potensi tinggi sebagai agens biokontrol. Penggunaan khamir sebagai agens biokontrol patogen pada komoditas pra- dan pascapanen pada saat ini telah dikembangkan. Beberapa spesies khamir telah dilaporkan dapat mengendalikan patogen tanaman seperti *Candida sake* (Arrarte *et al.*, 2017; Calvo-Garrido *et al.*, 2013; Carbo *et al.*, 2018), *Candida subhashii* (Hilber-Bodmer *et al.*, 2017), *Aureobasidium pullulans* (Bozoudi & Tsaltas, 2018; Di Francesco *et al.*, 2014; Freimoser *et al.*, 2019), *Metschnikowia fructicola* dan *Metschnikowia pulcherrima* (Hilber-Bodmer *et al.*, 2017; Parafati *et al.*, 2015), *Pichia* spp. (Haïssam, 2011; Sugiprihatini *et al.*, 2011) dan lain-lain. Khamir berpotensi antagonis tersebut dapat diisolasi dari berbagai habitat karena khamir memiliki rentang fisiologi yang luas, sehingga mampu tumbuh dalam kisaran lingkungan yang luas pula. Hal ini disebabkan oleh kemampuan metabolisme khamir di antaranya dalam proses asimilasi, fermentasi dan oksidasi (Kurtzman & Fell, 2012).

Identifikasi mikroorganisme dalam ilmu penyakit tumbuhan memegang peran yang sangat penting. Identifikasi tersebut perlu dilakukan baik terhadap mikroorganisme penyebab penyakit maupun terhadap agens antagonis. Identifikasi mikroorganisme patogenik dibutuhkan dalam menentukan penyebab suatu penyakit tanaman, sehingga dapat dilakukan tindakan pengendalian yang tepat terhadap mikroorganisme patogenik tersebut. Sementara identifikasi agens antagonis juga dibutuhkan dalam menentukan mikroorganisme yang dapat digunakan dalam pengendalian hayati suatu penyakit, supaya dapat dilakukan pengujian maupun aplikasinya di lapangan dengan tepat.

Identifikasi khamir dapat dilakukan secara konvensional dan molekuler. Identifikasi khamir secara konvensional dilakukan berdasarkan morfologi, fisiologi dan biokimia (Kurtzman & Fell, 2012). Akan tetapi, identifikasi khamir berdasarkan morfologi sulit dilakukan karena secara morfologi khamir sulit dibedakan. Hal ini disebabkan khamir memiliki karakter morfologi yang sederhana dan tidak mempunyai banyak variasi, sehingga karakter morfologi tidak dapat digunakan untuk identifikasi sampai tingkat spesies (Guarro *et al.*, 1999). Identifikasi khamir secara konvensional juga dapat dilakukan berdasarkan sifat fisiologi dan biokimianya. Metode identifikasi berdasarkan karakter fisiologi dan biokimia umum dilakukan untuk khamir. Namun, identifikasi secara fisiologi dan biokimia memiliki kelemahan di antaranya memerlukan waktu pengujian yang lama, membutuhkan interpretasi subyektif dan karakter fisiologi dan biokimia jenis khamir yang berkerabat dekat seringkali identik sehingga dapat menyebabkan kesalahan dalam identifikasi (Daniel & Meyer, 2003). Kelemahan metode konvensional dalam mengidentifikasi khamir dapat diatasi dengan menggunakan metode molekuler. Identifikasi khamir dengan metode molekuler dapat memberikan hasil yang lebih akurat dibandingkan dengan metode konvensional. Berbagai teknik deteksi dan identifikasi organisme secara molekuler telah dikembangkan antara lain melalui teknik *polymerase chain reaction* (PCR). PCR adalah metode reaksi berantai yang merupakan suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*. Teknik PCR pada awal perkembangannya hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA, tetapi kemudian dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat digunakan pula untuk melipatgandakan dan

melakukan kuantifikasi molekul mRNA. Teknik PCR digunakan untuk analisis dan berbagai macam manipulasi genetik dan memiliki sensitivitas yang tinggi, serta lebih efisien.

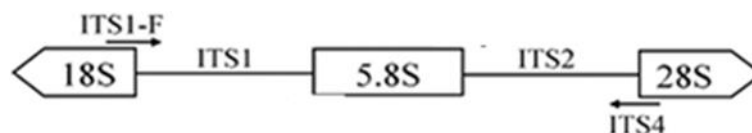
Selain berperan sebagai agens antagonis, khamir juga diketahui dapat menjadi patogen baik pada tanaman, hewan dan manusia (Matteson Heidenreich *et al.*, 1997). Salah satu kriteria agens antagonis dapat diaplikasikan di lapangan adalah apabila agens antagonis tersebut aman terhadap organisme nontarget. Oleh karena itu, isolat khamir yang telah diketahui berpotensi sebagai agens antagonis perlu diuji potensi resikonya terhadap organisme nontarget. Potensi risiko khamir terhadap nontarget, misalnya terhadap mamalia dapat diketahui melalui uji pembentukan toksin hemolisin. Toksin hemolisin adalah toksin yang dapat melisis sel darah merah mamalia. Pembentukan toksin hemolisin pada media agar darah dapat digunakan untuk mengetahui potensi patogenik khamir terhadap mamalia (Luo *et al.*,

2001; Suardana dkk., 2014). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi isolat-isolat khamir berpotensi antagonis dengan metode molekuler dan mengetahui potensi resikonya terhadap mamalia dengan mendeteksi kemampuannya dalam menghasilkan toksin hemolisin.

BAHAN DAN METODE

Identifikasi Khamir secara Molekuler

Identifikasi khamir secara molekuler dilakukan di Laboratorium Virologi Tumbuhan Departemen Proteksi Tanaman IPB dan Laboratorium Biomolekuler Balai Uji Terap Teknik dan Metode Karantina Pertanian (BUTTMKP) Bekasi. Identifikasi khamir antagonis dilakukan dengan PCR menggunakan primer umum dengan pasangan *forward primer* ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') dan *reverse primer* ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Gambar 1) menurut metode Mirhendi *et al.* (2007).



Gambar 1. Bagan disain primer ITS 1 dan ITS 4 pada daerah gen ribosomal DNA

Penyediaan Isolat Khamir

Isolat khamir yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 15 isolat yaitu Dmg 2 BEP, Dmg 11 DEP, Dmg 16 BEP, Dmg 18 BEP, Dmg 20 DEP, Dmg 23 DEP, Dmg 27 BEP, Dmg 28 DEP, Dmg 29 DEP, Dmg 30 DEP, Dmg 32 DEP, Lm 6 BE, Lm 13 BE, SG 25 BE, dan SG 53 BE. Isolat khamir tersebut telah diisolasi dari tanaman cabai dan telah diketahui memiliki potensi sebagai agens antagonis *Colletotrichum acutatum* penyebab penyakit antraknosa cabai pada penelitian sebelumnya (Hartati, 2016). Isolat khamir yang diidentifikasi diremajakan dalam media *Yeast Malt Extract Broth* (YMB), selanjutnya ditumbuhkan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA). Khamir berumur 5 hari digunakan untuk identifikasi.

Ekstraksi Total Genomik DNA Khamir

Total genomik DNA khamir diekstraksi dengan menggunakan FastDNA SPIN Kit (MPBio Thermoscientific). Biakan khamir berumur 5 hari pada media PDA diambil sebanyak 1 lup, dimasukkan dalam *lysing matrix tube* yang berisi 1

ml buffer Kit CLS-Y. Khamir dan buffer dihomogenasi dengan *Super FastPrep-1* (MPBio Thermoscientific), selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil $\pm 800 \mu\text{l}$ dan dipindahkan ke *microtube* 2 ml. Supernatan ditambah dengan *binding matrix* sebanyak volume supernatan, selanjutnya dicampur dengan cara dibolak-balik dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Setengah dari volume supernatan dan *binding matrix* ($\pm 700 \mu\text{l}$) dipindahkan ke *tube spin filter* dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit, selanjutnya larutan dalam tube bagian bawah dibuang. Tahap ini diulang terhadap sisa larutan yang ada. Pelet yang didapatkan ditambah dengan $500 \mu\text{l}$ SEWS-M dan dihomogenisasi dengan mikrotip. Pelet tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit, supernatan dibuang, tube diganti dengan yang baru. Tanpa penambahan apapun, pelet disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 selama 2 menit. Tube diganti dengan tube berukuran 1,5 ml yang baru. DNA yang didapatkan diekstraksi dengan $100 \mu\text{l}$ DES

dan diinkubasi pada suhu 55 °C selama 5 menit. DNA disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Spin filter yang berisi kotoran dibuang. DNA berbentuk cairan bening disimpan pada suhu -20 °C untuk penyimpanan jangka panjang atau pada 4 °C untuk penyimpanan jangka pendek.

Amplifikasi Gen ITS1 dan ITS4 Khamir dengan PCR

Perlakuan Amplifikasi DNA khamir menggunakan mesin PCR (Gene Amp®, PCR System 9700) dengan primer umum ITS1 dan ITS4. Larutan DNA sebanyak 2 µl (±500 ng) diamplifikasi dengan volume reaksi 25 µl yang terdiri dari 12,5 µl master mix (Thermoscientific), 1 µl (10 pmol) *forward primer* (ITS1) (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), 1 µl (10 pmol) *reverse primer* (ITS4) (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), dan 8,5 µl dH₂O. Amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR yang dimulai dengan denaturasi awal 95°C selama 5 menit. Selanjutnya program PCR mencakup denaturasi 95°C selama 45 detik, *annealing* 55°C selama 30 detik dan *extension* 72°C selama 1 menit 30 detik diulang sebanyak 35 siklus. Program tersebut diakhiri dengan *final extension* 72°C selama 7 menit. Elektroforesis dilakukan dalam 1,5% w/v gel agarose (TopVision, Frementas) dengan marker *GeneRuler* 100 pb DNA *Ladder* (Fermentas) dan diwarnai dengan ethidium bromide. Hasil PCR disikuen di PT *First Base Genetica Science* menggunakan pasangan primer ITS1 dan ITS4. Analisis homologi nukleotida khamir menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) di www.blast.ncbi.nlm.nih.gov.

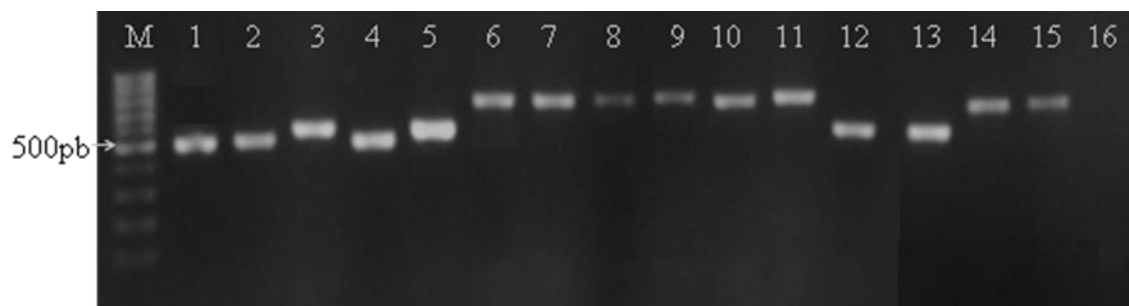
Pengujian Kemampuan Khamir dalam Menghasilkan Hemolisin

Pengujian kemampuan khamir dalam menghasilkan hemolisin dilakukan untuk mengetahui apakah isolat khamir yang diuji menghasilkan toksin hemolisin. Pengujian dilakukan dengan menggoreskan isolat khamir umur 5 hari pada media *blood agar base* (Oxoid CM55) yang telah ditambah darah domba 5%, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 sampai 48 jam. Pengujian menunjukkan hasil positif produksi hemolisin apabila terbentuk zona bening di sekitar koloni setelah inkubasi (Suardana *et al.*, 2014). Sebagai kontrol positif, digunakan bakteri endofit ubi jalar isolat EAM(7), EAM(8), EAM(9), EAM(10), EUM(13) dan EBM (8) (koleksi Tuminem Laboratorium Nematologi Tumbuhan IPB) yang diketahui menghasilkan hemolisin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Khamir secara Molekuler

Identifikasi spesies 15 isolat khamir yang berpotensi antagonis terhadap *C. acutatum* cabai pada gen 18S, ITS1, gen 5,8S, ITS2, dan gen 28S ribosomal DNA (Gambar 1) menunjukkan bahwa 15 isolat khamir tersebut teramplifikasi dengan primer ITS1 dan ITS4 dengan ukuran fragmen produk antara 500-800 pb (Gambar 2). Tiga DNA isolat khamir yaitu Dmg 2 BEP, Lm 6 BE, Lm 13 BE, teramplifikasi dengan primer ITS1 dan ITS4 dengan ukuran fragmen produk 500 pb. Empat DNA isolat khamir yaitu Dmg 11 DEP, Dmg 29 DEP, Dmg 30 DEP dan Dmg 16 DEP teramplifikasi dengan primer ITS1 dan ITS4 dengan ukuran fragmen produk 600 pb. Delapan DNA khamir yaitu Dmg 18 BEP, Dmg 20 DEP, Dmg 23 DEP, Dmg 27 BEP, Dmg 32 DEP, Dmg 28 DEP, SG 25 BE dan SG 53 BE teramplifikasi dengan ukuran fragmen produk 800 pb (Gambar 2).



Gambar 2. Visualisasi DNA khamir hasil amplifikasi menggunakan primer ITS1 dan ITS4 dengan penanda DNA 100 pb. M: marker 100 pb, 1. Dmg 2 BEP, 2. Lm 6 BE, 3. Dmg 11 DEP, 4. Lm 13 BE, 5. Dmg 16 BEP, 6. Dmg 18 BEP, 7. Dmg 20 DEP, 8. Dmg 23 DEP, 9. SG 25 BE, 10. Dmg 27 BEP, 11. Dmg 28 DEP, 12. Dmg 29 DEP, 13. Dmg 30 DEP, 14. Dmg 32 DEP, 15. SG 53 BE, 16. kontrol (-)

Berdasarkan hasil penelitian ini diketahui bahwa 15 isolat khamir antagonis yang berpotensi sebagai agens antagonis penyebab antraknosa cabai berhasil diidentifikasi dengan menggunakan primer umum ITS1 dan ITS4 pada rDNA. Posisi daerah yang diamplifikasi adalah sebagian gen 18S, ITS1, gen 5,8S, ITS2, dan sebagian gen 28S ribosomal DNA (Gambar 1). Gen-gen yang terdapat dalam ribosomal DNA (rDNA) adalah kelompok gen yang umumnya digunakan untuk mengidentifikasi khamir dengan cepat dan akurat (Kutrzman & Robnet, 2003). Sekuen daerah *internal transcribed spacers* (ITS) dari rDNA dapat digunakan untuk mengidentifikasi khamir. Daerah ITS rDNA merupakan daerah *non-coding* yang memiliki laju mutasi tinggi, sehingga memiliki variasi urutan nukleotida yang tinggi antar jenis (James & Stratford, 2003; Ciardo, 2006; Purnamasari dkk., 2012). Daerah ITS rDNA dapat digunakan untuk identifikasi jenis khamir yang berkerabat sangat dekat (James & Stratford, 2003).

Tahap ekstraksi DNA yang dilakukan dari koloni khamir berumur 5 hari sangat tepat, karena pada umur tersebut khamir telah memasuki fase log (fase eksponensial). Kaitan fase log khamir dengan keberhasilan ekstraksi dan identifikasi adalah pada fase log didapatkan kandungan DNA tertinggi suatu mikroorganisme. Hal ini disebabkan fase log merupakan fase pertumbuhan populasi organisme yang paling aktif.

Hasil analisis sekuensing isolat khamir Lm 13 BE, Lm 6 BE, Dmg 30 DEP, Dmg 29 DEP, Dmg 11 DEP, Dmg 2 BEP, Dmg 16 BEP, Dmg 18 BEP, Dmg 20 DEP, Dmg 23 DEP, SG 25 BE, Dmg 27 BEP, Dmg 28 DEP, Dmg 32 DEP, dan SG 53 BE menunjukkan nilai homologi yang tinggi yaitu antara 94-100% dan nilai *query cover* antara 52-100%, kecuali Dmg 23 DEP nilai homologi hanya 73%. Identifikasi 15 isolat khamir antagonis secara molekuler tersebut didapatkan 6 spesies khamir yaitu *Candida tropicalis*, *Rhodotorula minuta*, *Aureobasidium pullulans*, *Pseudozyma hubeiensis*, *Pseudozyma aphidis*, dan *Pseudozyma shanxiensis* (Tabel 1). Dua isolat khamir endofit SG 25 BE dan SG 53 BE menunjukkan nilai homologi yang tinggi dengan *P. aphidis* yaitu masing-masing sebesar 100%. Nilai homologi yang tinggi juga ditunjukkan oleh isolat Dmg 11 DEP, Dmg 29 DEP, dan Dmg 30 DEP dengan *A. pullulans* yaitu berturut-turut sebesar 100, 99, 99%. Tiga isolat khamir Lm 6 BE, Lm 13 BE, dan Dmg 2 BEP memiliki nilai homologi yang sama yaitu 99% dengan *Ca. tropicalis*. Lima isolat khamir epifit memiliki nilai homologi berkisar antara 73-98% dengan *P. hubeiensis* yaitu Dmg 18 BEP, Dmg 20 DEP, Dmg 23 DEP, Dmg 27 BEP, dan Dmg 32 DEP, sedangkan isolat Dmg 16 BEP dan Dmg 28 DEP berturut-turut menunjukkan nilai homologi 96% dengan *R. minuta* dan 94% dengan *P. shanxiensis* (Tabel 1).

Tabel 1. Identifikasi isolat khamir berpotensi antagonis dengan sekuensing gen ITS1 dan ITS4 rDNA

Isolat khamir	Alesi	Asal isolat GenBank	Homologi (%) / Qc ^a	Spesies
Dmg 11 DEP	JQ235061.1	<i>Populus euphratica</i> , China	100/57	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Dmg 29 DEP	JQ235061.1	<i>Populus euphratica</i> , China	99/73	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Dmg 30 DEP	JQ235061.1	<i>Populus euphratica</i> , China	99/54	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Lm 6 BE	AF321539.1	Buah jeruk, Spanyol	99/56	<i>Candida tropicalis</i>
Lm 13 BE	AF321539.1	Buah jeruk, Spanyol	99/52	<i>Candida tropicalis</i>
Dmg 2 BEP	AF321539.1	Buah jeruk, Spanyol	99/72	<i>Candida tropicalis</i>
SG 25 BE	KF443199.1	Daun mulberi, China	100/100	<i>Pseudozyma aphidis</i>
SG 53 BE	KF443199.1	Daun mulberi, China	100/100	<i>Pseudozyma aphidis</i>
Dmg 16 BEP	HQ832824.1	<i>Camellia sinensis</i> , China	96/53	<i>Rhodotorula minuta</i>
Dmg 28 DEP	DQ008956.1	Daun, China	94/98	<i>Pseudozyma shanxiensis</i>
Dmg 18 BEP	DQ008954.1	Daun, China	96/98	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>
Dmg 20 DEP	DQ008954.1	Daun, China	98/94	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>
Dmg 23 DEP	DQ008954.1	Daun, China	73/92	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>
Dmg 27 BEP	DQ008954.1	Daun, China	98/58	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>
Dmg 32 DEP	DQ008954.1	Daun, China	95/97	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>

Keterangan: ^a Persentase homologi fragmen DNA dianalisis dengan program BLAST dan sekuen dibandingkan dengan database dari NCBI, daerah gen ribosomal DNA yang digunakan adalah ITS1 & ITS4, Qc: *Query cover*

Isolat-isolat khamir yang diisolasi dari daun dan buah cabai berdasarkan hasil penelitian ini diketahui didominasi oleh spesies dari genus *Pseudozyma* sebanyak 8 isolat yaitu *P. hubeiensis*, *P. aphidis*, dan *P. shanxiensis*. Lima isolat khamir diidentifikasi sebagai *P. hubeiensis*. Berdasarkan penelitian sebelumnya isolat yang teridentifikasi sebagai spesies *P. hubeiensis* dan *P. shanxiensis* merupakan spesies epifit, sedangkan isolat yang teridentifikasi sebagai *P. aphidis* merupakan spesies endofit (Hartati, 2016). Hal ini menunjukkan bahwa anggota genus *Pseudozyma* dapat hidup baik pada permukaan maupun di dalam jaringan tanaman.

Pseudozyma spp. adalah khamir yang memiliki bentuk dimorfik yang termasuk dalam filum Basidiomycota, kelas Ustilaginomycetes, ordo Ustilaginales. *Pseudozyma* umumnya bersifat epifit atau saprofit dan tidak bersifat patogenik terhadap tanaman, hewan dan serangga (Avis & Belanger, 2002). Genus *Pseudozyma* telah dilaporkan berpotensi sebagai agens biokontrol (Buxdorf *et al.*, 2013; Gafni *et al.*, 2015). Spesies *P. aphidis* (Henninger & Windisch) Boekhout mampu menekan *powdery mildew* yang disebabkan oleh *Podosphaera xanthii* (Gafni *et al.*, 2015). *P. aphidis* juga dilaporkan memiliki kemampuan menekan *Botrytis cinerea* pada tomat (Buxdorf *et al.*, 2013).

Tiga isolat khamir yang terdiri dari 1 isolat epifit (Dmg 2 BEP) dan 2 isolat endofit (Lm 6 BE dan Lm 13 BE) yang didapatkan dari penelitian sebelumnya diidentifikasi sebagai *Ca. tropicalis* (Hartati, 2016). Isaeva *et al.* (2010) melaporkan bahwa terdapat persamaan spesies khamir endofit yang diisolasi dari dalam jaringan buah dengan spesies khamir epifit yang diisolasi dari permukaan buah. Namun demikian, terdapat beberapa perbedaan dalam sifat-sifat komunitas khamir epifit dan endofit (Isaeva *et al.*, 2010). Khamir *Ca. tropicalis* telah dilaporkan memiliki potensi sebagai agens antagonis terhadap beberapa patogen (Sriram & Poornachandra, 2013; Fahriani & Wiyono, 2018). Khamir *Ca. tropicalis* yang diisolasi dari permukaan buah mangga mampu menekan penyakit busuk buah pada mangga (Sriram & Poornachandra, 2013). Khamir *Ca. tropicalis* juga dilaporkan mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman padi (Amprayn *et al.*, 2012). Spesies *Ca. tropicalis* (Castellani) Berkhout diklasifikasikan ke dalam filum Ascomycota, ordo Saccharomycetales.

Isolat Dmg 16 BEP yang diidentifikasi sebagai *R. minuta* didapatkan dari penelitian sebelumnya dari permukaan buah cabai sebagai epifit. Isaeva *et*

al. (2010) melaporkan bahwa spesies dari genus *Rhodotorula* lebih sering didapatkan dari permukaan buah dibandingkan dari jaringan tanaman. *Rhodotorula* merupakan genus khamir yang dapat ditemukan dimana-mana dan bersifat saprofit (Sjamsuridzal *et al.*, 2010). *Rhodotorula* telah digunakan sebagai penghasil karoten, genus ini juga dilaporkan berperan sebagai agens biokontrol patogen tanaman (Patiño-Vera *et al.*, 2005; Fahriani & Wiyono, 2018; Setiawan *et al.*, 2020). Khamir *R. minuta* (Saito) F.C. Harrison diklasifikasikan ke dalam filum Basidiomycota, ordo Sporidiobolales (Kurtzman & Fell, 2012).

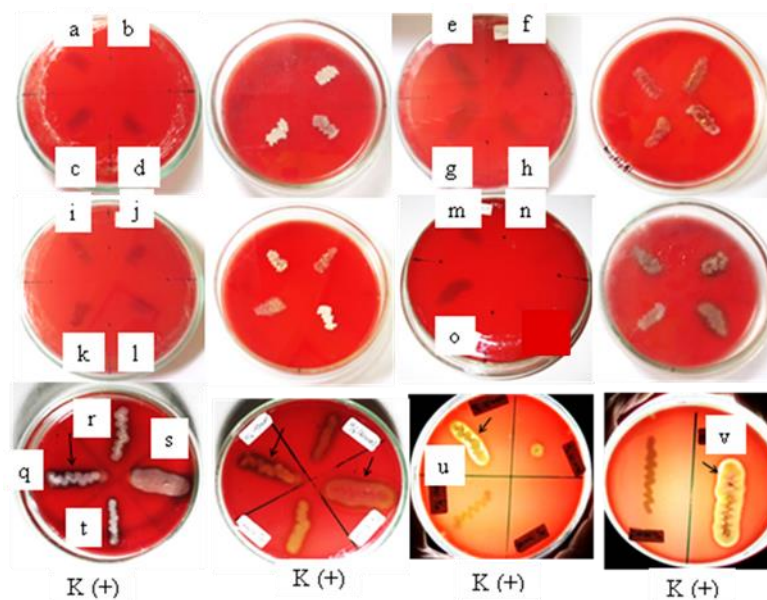
Tiga isolat khamir epifit dari permukaan daun cabai yang didapatkan dari penelitian sebelumnya yaitu Dmg 11 DEP, Dmg 29 DEP, dan Dmg 30 DEP diidentifikasi sebagai *A. pullulans*. Spesies *A. pullulans* (de Bary) Arnaud merupakan anggota filum Ascomycota, ordo Dothideales. Spesies ini sering disebut sebagai *black yeast* dan pada umumnya ditemukan sebagai epifit di permukaan tanaman, dapat juga sebagai endofit di dalam jaringan tanaman (Osono, 2008; Martini *et al.*, 2009). Spesies *A. pullulans* bersifat kosmopolit, mengkoloni permukaan daun, dan memiliki kemampuan beradaptasi dengan baik di filosfer (Singh *et al.*, 2015). Spesies *A. pullulans* dikenal baik dalam industri dan pertanian (Arzanlou, 2014). Dalam bidang pertanian, *A. pullulans* dikenal sebagai agens biokontrol (Di Francesco *et al.*, 2017; Hartati *et al.*, 2015; Mari *et al.*, 2012). Spesies ini juga dikenal menghasilkan produk komersial, pullulan, *biodegradable extracellular polysaccharide*, dan berpotensi sebagai agens biokontrol patogen pascapanen (Singh *et al.*, 2015; Zalar *et al.*, 2008). Khamir *A. pullulans* menunjukkan polimorfisme, yaitu dapat tumbuh sebagai khamir dengan membentuk sel tunas atau membentuk miselia (Singh *et al.*, 2015).

Kemampuan Khamir dalam Menghasilkan Hemolisin

Uji kemampuan khamir dalam menghasilkan hemolisin merupakan salah satu parameter uji potensi resiko khamir terhadap mamalia. Hasil uji pada penelitian ini menunjukkan bahwa seluruh khamir antagonis tidak menghasilkan toksin hemolisin. Hal ini ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona bening maupun perubahan warna di sekitar koloni khamir antagonis pada media agar darah baik setelah 24 maupun 48 jam (Gambar 3). Pembentukan toksin hemolisin ditandai dengan terbentuknya zona hemolisis di sekitar

koloni mikroorganisme uji. Zona hemolisis yang ditandai dengan pembentukan zona bening pada media agar darah di sekitar koloni mikroorganisme uji menunjukkan bahwa mikroorganisme tersebut menghasilkan beta hemolisin (Luo *et al.* 2001). Toksin beta hemolisin mampu menghancurkan sel darah merah dengan sempurna (Luo *et al.* 2001). Alpha hemolisin ditunjukkan oleh adanya zona berwarna kehijauan di sekitar koloni mikroorganisme uji pada media agar darah (Luo *et al.* 2001). Alpha hemolisin merubah warna media agar darah dengan mereduksi hemoglobin menjadi

meta hemoglobin (Luo *et al.* 2001). Kontrol positif dengan menggunakan bakteri endofit ubi jalar isolat EAM(7), EAM(8), EAM(9), EAM(10), EUM(13) dan EBM (8) menunjukkan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri pada media agar darah pada 48 jam setelah perlakuan. Hasil pengujian potensi resiko khamir berpotensi antagonis dengan media agar darah dalam penelitian ini menunjukkan bahwa isolat khamir tersebut diduga tidak berpotensi patogenik terhadap mamalia berdasarkan ketidakmampuannya dalam menghasilkan toksin hemolisin.



Gambar 1. Uji hemolisis isolat khamir pada media agar darah a. Dmg 2 BEP, b. SG 53 BE, c. Lm 13 BE, d. SG 25 BE, e. Dmg 20 DEP, f. Dmg 16 DEP, g. Lm 6 BE, h. Dmg 18 DEP, i. Dmg 23 DEP, j. Dmg 32 DEP, k. Dmg 28 DEP, l. Dmg 27 BEP, m. Dmg 30 DEP, n. Dmg 11 DEP, o. Dmg 29 DEP, K(+): kontrol positif bakteri endofit ubi jalar q. EAM(10), r. EAM(7), s. EAM(8), t. EAM(9), u. EBM (8), v. EUM(13)

SIMPULAN

Berdasarkan hasil identifikasi secara molekuler terhadap 15 isolat khamir berpotensi antagonis diperoleh 6 spesies khamir yaitu *Candida tropicalis*, *Rhodotorula minuta*, *Aureobasidium pullulans*, *Pseudozyma hubeiensis*, *Pseudozyma aphidis* dan *Pseudozyma shanxiensis*. Dua spesies khamir termasuk dalam filum Ascomycota yaitu *Ca. tropicalis* dan *A. pullulans*, dan 4 spesies termasuk dalam filum Basidiomycota yaitu *R. minuta*, *P. hubeiensis*, *P. aphidis* dan *P. shanxiensis*. Berdasarkan uji kemampuan khamir dalam menghasilkan hemolisin diketahui bahwa khamir antagonis tersebut tidak menghasilkan hemolisin

sehingga berpotensi tidak bersifat patogenik terhadap mamalia.

DAFTAR PUSTAKA

- Amprayn, K, MT Rose, M Kecskés, L Pereg, HT Nguyen, and IR Kennedy. 2012. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. *Applied Soil Ecology*. 61: 295-299.
- Arrarte, E, G Garmendia, C Rossini, M Wisniewski, and S Vero. 2017. Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of

- postharvest pathogens of apples. *Biological Control*. 109: 14-20.
- Arzanlou, M. 2014. Molecular characterization of *Aureobasidium* species in Iran. *Research in Molecular Medicinal*. 2(2): 28-33.
- Avis, TJ, and RR Bélanger . 2002. Mechanisms and means of detection of biocontrol activity of *Pseudozyma* yeasts against plant-pathogenic fungi. *FEMS Yeast Research*. 2(1): 5-8.
- Bozoudi, D, and D Tsaltas. 2018. The Multiple and Versatile Roles of *Aureobasidium pullulans* in the Vitivinicultural Sector. *Fermentation*. 4(85): 1-15.
- Buxdorf, K, I Rahat, A Gafni, and M Levy. 2013. The epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* induces jasmonic acid- and salicylic acid/nonexpressor of PR1-independent local and systemic resistance. *Plant Physiology*. 161: 2014-2022.
- Calvo-Garrido, C, I Viñas, P Elmer, J Usall, and N Teixido. 2013. *Candida sake* CPA-1 and other biologically based products as potential control strategies to reduce sour rot of grapes. *Letters in Applied Microbiology*. 57: 356-361.
- Carbo, A, R Torres, N Teixido, J Usall, A Medina, and N Magan. 2018. Impact of climate change environmental conditions on the resilience of diferent formulations of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 on grapes. *Letters in Applied Microbiology*. 67(1): 2-8.
- Ciardo, DE, G Schär, EC Böttger, M Altwegg, and PP Bosshard. 2006. Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(1): 77-84.
- Daniel, HM, and W Meyer. 2003. Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology*. 86:61-78.
- Di Francesco, A, F Milella, M Mari, and R Roberti. 2017. A preliminary investigation into *Aureobasidium pullulans* as a potential biocontrol agent against *Phytophthora infestans* of tomato. *Biological Control*. 114: 144-149.
- Di Francesco, A, L Ugolini, L Lazzeri, and M Mari. 2014. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biological Control*. 81: 8-14.
- Fahriani, U, dan S Wiyono. 2018. Seleksi khamir antagonis sebagai agens biokontrol penyakit bercak daun Cercospora pada Anggrek Dendrobium. *Communications of Horticultural Journal*. 2(2): 46-53.
- Freimoser, FM, MP Rueda-Mejia, B Tilocca, and Q Migheli. 2019. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 35: 154.
- Gafni, A, CE Calderon, R Harris, K Buxdorf, A Dafa-berger, E Zelinger, and M Levy. 2015. Biological control of the cucurbit powdery mildew pathogen *Podosphaera xanthii* by means of the epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* and parasitism as a mode of action. *Frontiers in Plant Science*. 6:132-142.
- Guarro, J, J Gene, and AM Stchigel. 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 454-500.
- Haïssam, JM. 2011 *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research and practical application. *Antonie van Leeuwenhoek*. 99: 93-105.
- Hartati, S, S Wiyono, SH Hidayat, and MS Sinaga. 2015. Mode of action of yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans* in controlling anthracnose of postharvest chili. *International Journal of Innovative and Applied Research*. 4531: 253-263.
- Hartati, S. 2016. Khamir sebagai Agens Biokontrol Antraknosa (*Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds) pada Cabai Pascapanen. [Disertasi]. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Hilber-Bodmer, M, M Schmid, CH Ahrens, and FM Freimoser. 2017. Competition assays and physiological experiments of soil and phyllosphere yeasts identify *Candida subhashii* as a novel antagonist of filamentous fungi. *BMC Microbiology*. 17: 4.
- Isaeva, OV, AM Glushakova, SA Garbuz, AV Kachalkin, and IY Chernov. 2010. Endophytic yeast fungi in plant storage tissues. *Biology Bulletin*. 37(1): 26-34.
- James, SA, and M Stratford. 2003. Spoilage Yeast with Emphasis on the Genus *Zygosaccharomyces*. Dalam: Boekhout T, Robert V (eds). 2003. *Yeast in Food*. Cambridge (GB): Woodhead Publishing Limited. p.171-191.

- Kurtzman, CP, and JW Fell. 2012. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 5th ed. Amsterdam (NL): Elsevier Science Publishers.
- Kurtzman, CP, and CJ Robnett. 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the '*Saccharomyces* complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research*. 3: 417-432.
- Luo, G, LP Samaranayake, and JYY Yau. 2001. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(8): 2971-2974.
- Martini, M, R Musetti, S Grisan, R Polizzotto, S Borselli, F Pavan, and R Osler. 2009. DNA-dependent detection of the grapevine fungal endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. *Plant Diseases*. 93: 993-998.
- Mari, M, C Martini, A Spadoni, W Rouissi, and P Bertolini. 2012. Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*. 73: 56-62.
- Matteson Heidenreich, MC, MR Corral-Garcia, EA Momol, and TJ Burr. 1997. Russet of apple fruit caused by *Aureobasidium pullulans* and *Rhodotorula glutinis*. *Plant Diseases*. 81:337-342.
- Mirhendi, H, K Diba, A Rezaei, N Jalalizand, L Hosseinpour, and H Khodadadi. 2007. Colony-PCR is a rapid and sensitive method for DNA amplification in yeasts. *Iranian Journal of Public Health*. 36(1): 40-44.
- Osono T. 2008. Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of *Camellia japonica*: seasonal and leaf age-dependent variations. *Mycologia*. 100(3): 387-391.
- Parafati, L, A Vitale, C Restuccia, and G Cirvilleri. 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*. 47: 85-92.
- Patiño-Vera, M, B Jiménez, K Balderas, M Ortiz, R Allende, A Carrillo, and E Galindo. 2005. Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. *Journal of Applied Microbiology*. 99: 540-550.
- Purnamasari, MI, C Prihatna, AW Gunawan, and A Suwanto. 2012. Isolasi dan Identifikasi secara Molekuler *Ganoderma* spp. yang Berasosiasi dengan Penyakit Busuk Pangkal Batang di Kelapa Sawit. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 8(1): 9-15.
- Setiawan, W, S Wiyono, ET Tondok, A Kanti, and IM Sudiana. 2020. In vitro study of action mode of *Rhodotorula minuta* Dmg 16 BEP as biocontrol agents on *Alternaria solani*. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 24(1): 28-33.
- Singh, R, R Gaur, S Bansal, P Biswas, PK Pandey, and F Jamal. *Aureobasidium pullulans* - An industrially important pullulan producing black yeast. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. 4(10): 605-622.
- Sjamsuridzal, W, A Oetari, A Kanti, R Saraswati, C Nakashima, Y Widyastuti, and A Katsuhiko. 2010. Ecological and taxonomical perspective of yeast in Indonesia. *Microbiology Indonesia* 4: 60-68.
- Sriram, S, and SR Poornachanddra. 2013. Biological control of postharvest mango fruit rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and *Diplodia natalensis* with *Candida tropicalis* and *Alcaligenes faecalis*. *Indian Phytopathol*. 66(4):375-380.
- Suardana, IW, IH Utama, dan MH Wibowo. 2014. Identifikasi *Escherichia coli* O157:H7 dari feses ayam dan uji profil hemolisisnya pada media agar darah. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 8(1): 1-5.
- Sugiprihatini, D, S Wiyono, and Widodo. 2011. Selection of yeasts antagonists as biocontrol agent of mango fruit rot caused by *Botryodiplodia theobromae*. *Microbiology Indonesia*. 5(4): 154-159.
- Zalar P, C Gostincar, GS de Hoog, V Ursic, M Sudhadham, and N Gunde-Cimerman. 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*. 61: 21-38.